



Akciğer Transplantasyonunda Kolay Uygulanabilir İskemi ve Reperfüzyon Modeli

Easy Applicable Model of Ischemia and Reperfusion on Lung Transplantation

Akciğer İskemi ve Reperfüzyon Modeli / Lung Model of Ischemia and Reperfusion

Orhan Yücel¹, Yusuf Sinan Şirin², Adem Güler³, Mehmet Gamsızkan⁴, Mehmet Ali Şahin³, Ayşe Eken⁵, Siddık Arslan⁶, Sezai Çubuk¹, Onur Genç¹.

¹Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Göğüs Cerrahi AD, Ankara. ²Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Cerrahi AD, Burdur³.

³Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Kalp ve Damar Cerrahisi, ⁴Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Patoloji AD, Ankara.

⁵Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Farmasötik Toksikoloji AD, Ankara. ⁶Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü İstatistik Bölümü, Ankara, Türkiye.

Bu Çalışma, 5. Türk Göğüs Cerrahisi Kongresinde (14-17 Mayıs 2009, Kuşadası / Aydın) sunulmuştur.

Özet

Amaç

Akciğer transplantasyon (AT)'unda organ disfonksiyonunun en önemli nedenleri arasında yer alan iske mi reperfüzyon (İ/R) hasarını önlemek için birçok klinik ve deneysel çalışma yapılmıştır. Çalışmamızda İ/R hasarının araştırılabileceği bir AT modeli oluşturmayı amaçladık.

Gereç ve Yöntemler

Çalışmamızda Sprague Dawley ırkı, 200-225 gr ağırlığındaki 21 adet erkek rat kullandık. Her biri yedi rat içeren üç grup oluşturuldu. İlk grup kontrol grubu (KG), ikincisi donör grubu (DG) ve üçüncüsü İ/R grubu (İRG) olarak adlandırıldı. KG'daki deneklere herhangi bir ek işlem yapılmadan sol akciğer alt lobundan histopatolojik ve biyokimyasal inceleme için örnekleme yapıldı. DG'daki deneklere sol üst lobektomi ile allograft sol alt lob çıkarılma işlemi uygulandı. Sol alt lob çıkarılma esnasında pulmoner arter ve ven periferde doğru kateterize edildi. İRG'de DG deki gibi sol üst lobektomiyi takiben sol alt lobektomi uygulandı. Böylece sol pnömonektomi işlemi tamamlandı. DG'dan farklı olarak sol alt lob pulmoner arter ve ven santrale doğru kateterize edildi. Pulmoner arter ve ven kateterizasyon işleminden sonra allograft sol alt lob iki saat süreyle reperfüze ve reventile edildi. Allograft akciğerden histopatolojik ve biyokimyasal inceleme için örnekleme yapıldı. Bulgu ve sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildi.

Bulgular

Histopatolojik incelemede KG'na göre İRG'nda konjesyon, kanama, parankimal makrofaj ve PMN lökosit infiltrasyonu, amfizem, atelektazi, vakuolar dejenerasyon ve peribronşiyal lenfosit infiltrasyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı sonuç elde edildi. MDA seviyesinde ve GPx

Abstract

Aim

Many clinical and experimental studies have been made to prevent ischemia/ reperfusion (I/R) injury known as an important cause of organ dysfunction in lung transplantation (LT). In our study, we aimed to make a LT model in order to research I/R injury.

Material and Methods

In present study, we used 21 Sprague Dawley male rats weighting 200-225 gr. Three groups, each one including 7 rats, were formed. We named the first group as control, the second one as donor and the third one as ischemia/ reperfusion group (IRG), respectively. We obtained sampling from the left lung lower lobe without any additional procedure in the control group for histopathological and biochemical evaluation. Left upper lobectomy and allograft left lower lobectomy were performed in the donor group (EG). During the removal of the left lower lobe, pulmonary artery and vein were catheterized to periphery. Left lower lobectomy was performed in IRG, as following the upper left lobectomy in the DG. Thus, left pneumonectomy was completed. Unlike the DG, the left lower lobe pulmonary artery and vein were catheterized to central. After catheterization of the pulmonary artery and vein, allograft left lower lobe was reventilated and reperfused for two hours. The sampling from allograft lung was obtained for histopathological and biochemical study. The findings and the results are statistically evaluated.

Results

Histopathologically, there were statistically significant differences between CG and IRG in congestion, hemorrhage, parenchymal macrophages and PMN leukocyte infiltration, emphysema, atelectasis, vacuolar degeneration and peribronchial lymphocytic infiltration. We found increased mean MDA levels and GPx ac-

DOI: 10.4328/JCAM.10.1.13 Received: 13.10.2009 Accepted: 15.11.2009 Printed: 01.01.2010 J.Clin.Anal.Med. 2010;1.1:13-20

Corresponding author: Orhan Yücel, GATA Göğüs Cerrahisi AD, 06018 Etlik, Ankara, TURKEY,

Phone: +90 312 3045188, Fax: +90 312 3042700, E-mail: orhanyuel@yahoo.com

aktivitesinde İRG grubunun ortalamasında artış, SOD ve CAT aktivitesinde de İRG grubu ortalamasında azalma bulduk.

Sonuç

Çalışmamızda mikrocerrahi gerektirmeyen, kısa sürede uygulanabilen, karmaşık prosedür içermeyen, ucuz, geliştirilebilir ve İ/R hasarının araştırılabileceği bir AT modeli geliştirildi.

Anahtar Kelimeler

Akciğer Transplantasyonu, İskemi Reperfüzyon Hasarı, Transplantasyon Modeli.

Giriş

Akciğer transplantasyonu (AT) terminal dönem akciğer hastalıklarında en önemli tedavi seçeneklerinden biridir [1-4]. AT işlemi günümüzde birçok merkezde başarıyla uygulanmaktadır. Ancak postoperatif morbidite ve mortalitesi oldukça yüksektir. Morbidite ve mortaliteyi arttıran organ disfonksiyonunun fizyopatolojisi tam olarak aydınlatılamamıştır. Organ disfonksiyonunun en önemli nedeni allograft akciğer dokusu (AAD)'nin iskemik reperfüzyon (İ/R) hasarına maruz kalmasıdır [2,3]. AAD'nun elde edilmesi ve transplantasyonu esnasında, kaçınılmaz bir şekilde, kan dolaşımının durması ile organ iskemiyeye maruz kalmaktadır. Hücre düzeyinde öncelikle tersiner iske-

Gereç ve Yöntemler

Çalışmada Sprague Dawley ırkı, 200-225g ağırlığındaki 21 adet erkek rat kullanıldı. Her biri yedi rat içeren üç grup oluşturuldu. İlk grup kontrol grubu (KG), ikinci grup donör grubu (DG) ve üçüncü grup İ/R grubu (İRG) olarak adlandırıldı. Deneklere aşağıda özetlenen işlemler uygulandı.

Kontrol grubu (KG): KG'deki deneklere diğer deneklerle birlikte, herhangi bir ek işlem yapılmadan, üç gün aynı ortamda tutuldu ve standart rat yemiyle beslendi. Üçüncü günün sonunda denekler letal dozda anestezik verilerek sakrifiye edildi. Sol akciğer alt lobundan histopatolojik ve biyokimyasal inceleme için örneklem yapıldı.

Donör grubu (DG)

DG'deki denekler üç gün süreyle tüm deneklerle aynı ortamda standart rat yemiyle beslendi. Daha sonra aşağıdaki açıklanan prosedüre uygun olarak sol üst lobektomi ile allograft sol alt lob çıkarılma işlemi uygulandı (*).

(* Sol üst lobektomi, allograft sol alt lob akciğer dokusunun çıkarılma işlemi)

DG'deki deneklere genel anestezi uygulandı. Deneklere anestezik olarak 75 mg/kg ketamine ve 10 mg/kg xylazin kombinasyonu intraperitoneal olarak uygulandı ve indüksiyonu takiben operasyon bölgeleri tıraş edildi. Ratlar sırtüstü pozisyonda yatırılarak kaudal venden 15 U hepa-

ktivitesinde, decreased mean SOD and CAT activities.

Conclusion

In our study, we developed a LT model to research I/R, which does not require microsurgical procedure, has no complexity, inexpensive, modifiable and can be applied short time period.

Keywords

Lung Transplantation, Ischemia Reperfusion Injury, Transplantation Model.

mi hasarı gelişir. Daha sonra iskemik süresinin uzaması ile tersiner iskemik hasarı oluşur. İskemik reperfüzyon hasarını önlemek için birçok klinik ve deneysel çalışma yapılmıştır [3,5]. Deneysel çalışmaların uygulama zorluğu, deneysel prosedürün karmaşık olması, AT işleminin uzun sürmesi, mikrocerrahi uygulama gerektirmesi, deneklerin bakım ve beslenme sorunu, mali sorunlar, istatistiksel olarak yeterli sayıda denek elde edilememesi ve mortalitesinin yüksek olması nedeniyle pratikte uygulanması son derece zordur. Bu çalışmada mikrocerrahi gerektirmeyen, kısa sürede uygulanabilecek, karmaşık prosedür içermeyen, ucuz, geliştirilebilir ve İ/R hasarının araştırılabileceği bir AT modelinin oluşturulması amaçlandı.

rin enjeksiyonu yapıldı. Orta hat insizyonunu takiben trakeostomi uygulandı. Tidal volum 1.5 cc oda havası, 60 solunum/dakika ve PEEP 2 cm H₂O basıncı geçmeyecek şekilde destekli ventilasyon sağlandı. Median sternotomi insizyonu uygulanarak torasik kaviteye girildi. Sol hiler bölge diseke edilip sol pulmoner arter, ven ve bronş yapısı açığa çıkarıldı. Pulmoner arter ve venin üst lob dalları 5/0 serbest ipek sütür ile döndü, bağlandı ve kesildi. Sol üst lobun bronşu yine 4/0 serbest ipek sütür ile döndü, bağlandı ve kesildi. Sol üst lobektomi işlemi tamamlandı. Sol alt lobun pulmoner arter ve veni periferik yönde kateterize edildi. Yerleştirilen kateterler 4/0 serbest ipek sütür ile sabitlendikten sonra sol alt lob arter, ven ve bronşu döndü, bağlandı ve kesildi. AAD çıkarılma işlemi tamamlandı. Sol alt lob bronşuna üç yollu akım sağlayacak kateter yerleştirildi. Birinci hat sol alt lob bronşuna tespit edildi. İkinci hat intrabronşial basınç ölçere tespit edildi. Son hat ise ambuya tespit edildi. Sol akciğer alt lobunun arter kateterinden euro collins solüsyonu 1.5 cm H₂O basıncıyla verilerek yıkama işlemi gerçekleştirildi. Yıkama işlemi sırasında sol alt lob bronşundan AAD 0.2 cc oda havası, 60 solunum/dakika ve PEEP 1.5 cm H₂O basıncı geçmeyecek şekilde manuel reventile edildi. AAD euro collins solüsyonu içerisinde yarı ekspansiyon, +40C ve batacak şekilde

24 saat bekletildi. Denek, AAD elde edildikten sonra letal dozda genel anestezi verilerek sakrifiye edildi. Saklama

solüsyonunda 24 saat bekletildikten sonra AAD İRG'daki deneklerde reperfüze ve reventile edildi.

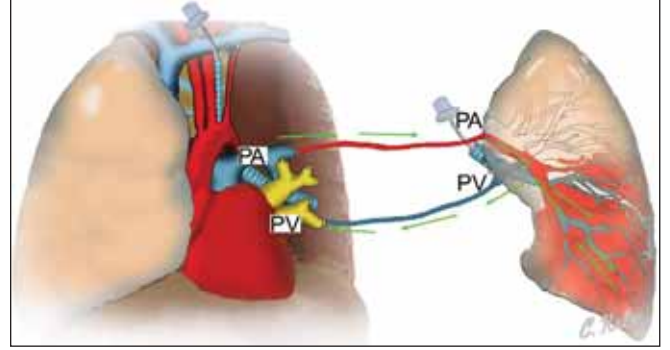
İ/R grubu (İRG)

Diğer deneklerle üç gün aynı ortam paylaşılan ve standart rat yemiyle beslenen deneklere daha sonra DG'deki gibi sol üst lobektomi ameliyatı uygulandı. DG'deki deneklerden farklı olarak sol alt loba giden pulmoner arter ve ven dalının proksimal yönde kateterizasyon işlemi, aşağıdaki prosedüre uygun olarak tamamlandı. Sol alt lob pulmoner arter ve ven kateterizasyon işlemi: İRG'daki deneklere DG'da uygulandığı gibi sol üst lobektomi ile sol alt lobun pulmoner arter ve ven kateterizasyon işlemi uygulandı. DG'dan farklı olarak pulmoner arter ve ven proksimal yönde kateterize edildi. Yerleştirilen kateterler 4/0 serbest ipek sütür ile sabitlendikten sonra sol alt lob arter, ven ve bronş dönülerek yine 4/0 serbest ipek ile bağlandı ve kesildi. Böylece kateterizasyon işlemi tamamlandı.

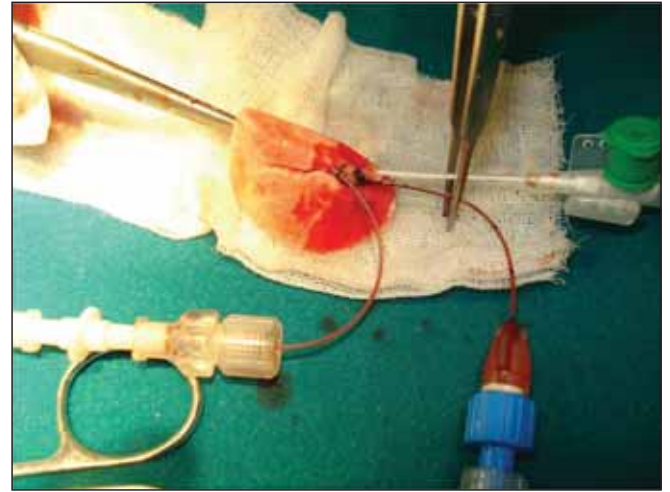
Pulmoner arter ve ven kateterizasyon işleminden sonra allogreft sol alt lob reperfüzyon ve reventilasyon işlemine geçildi. Sol akciğer alt lob pulmoner artere yerleştirilen kateter DG'den elde edilen akciğerin pulmoner arterindeki kateterle birleştirildi. Yine sol akciğer alt lob pulmoner vene yerleştirilen kateter DG'den elde edilen sol alt lob pulmoner vendeki kateter ile birleştirildi. Anastomoz işlemleri bittikten sonra reperfüzyona izin verildi. Eş zamanlı olarak ambu yardımıyla denek 1.2 cc oda havası, 60 solunum/dakika ve PEEP 1.5 cm H₂O basıncı geçmeyecek şekilde manuel reventile edildi. AAD ise ambu yardımıyla denek 0.2 cc oda havası, 60 solunum/dakika ve PEEP 1.5 cm H₂O basıncı geçmeyecek şekilde manuel reventile edildi. Reperfüzyon ve reventilasyon işlemine iki saat devam

Histopatolojik inceleme

Formalin solüsyonu (%10'luk) ile fikse edilen dokular, rutin takip işlemlerinden sonra, parafine gömüldü. Dört µm kalınlıkta kesilerek H-E ile boyandı. Elde edilen preparatlar bir patolog tarafından kör olarak incelendi. Konjesyon, kanama, perivasküler/alveolar ödem, amfizem, atelektazi, vakuolar dejenerasyon, peribronşiyal, perivasküler ve parankimal inflamatuvar hücre infiltrasyonu değerlendirildi. Ayrıca immünohistokimyasal inceleme için bloklardan 5 mm çapında doku çıkarıldı ve tekrar bloklanarak kesitler alındı. CD68 ve miyeloperoksidaz (MPO) (1/100, monoklonal, Neomarkers, Fremont, CA, US) antikoları ile avidin-biotin peroksidaz tekniği kullanılarak makrofaj ve PMN lö-



Resim 1. Ratlarda akciğer transplantasyon modeli (PA: Pulmoner arter, PV: Pulmoner Ven).



Resim 2. Akciğerin reperfüzyon ve reventilasyon işlemi.

edildi (Resim1, 2). İki saat sonrasında AAD'den histopatolojik ve biyokimyasal inceleme için örnekleme yapıldı. Kontrol grubunun sol alt lobu ve reperfüze, reventile edilen AAD'den elde edilen doku örneklerine aşağıdaki protokole uygun olarak histopatolojik ve biyokimyasal inceleme yapıldı.

kositlerin varlığı değerlendirildi.

Konjesyon, kanama, amfizem, atelektazi, vakuolar dejenerasyon ve ödem bulguları yaygınlığına göre; hiç yoksa : 0, %5'in altındaysa :1, %5-30 arasındaysa : 2, %30'un üstündeyse : 3 olarak skorlandı ve 0 ile 3 arasında olan toplam skor elde edildi.

İnflamatuvar hücre infiltrasyonu yok : 0 hafif :1, orta : 2, şiddetli :3 olmak üzere skorlandı. Bulguların yaygınlığına göre yok: 0, fokal (%5'in altındaysa) :1, %5-30 arasındaysa : 2, %30'un üstündeyse : 3 olarak skorlandı. Her iki skor birbiriyle çarpılarak 0 ile 9 arasında toplam skor elde edildi.

Oksidatif stres parametreleri olarak CuZn-SOD, CAT, Se-GPx enzim aktiviteleri ve MDA düzeyi ölçümü

Bu yöntemde ksantin-ksantin oksidaz sistemiyle süperoksit radikali üretilmekte ve oluşan süperoksit radikali, I.N.T. (Iodonitrotetrazolium) ile reaksiyon vererek viyole renkli formazon boyası oluşturmakta ve bu renk şiddeti 505 nm dalga boyunda ölçülmektedir. Ortamdaki CuZn-SOD aktivitesine bağlı olarak bu reaksiyon önlenmekte ve % inhibisyon hesaplanmaktadır. CuZn-SOD aktivitesi U/g olarak tanımlanır. Eken ve arkadaşları tarafından tanımlanan yöntem kısaca, doku homojenatları 30 kat 10mM fosfat tamponu (pH 7.00) ile dilüe edilir. 50 µl dilüsyonlu doku homojenatı, 50 mmol/L CAPS (3-(sikloheksilaminol)-1-propansülfonik asit) ve 0.094 mmol/L EDTA (pH 10.2) içeren bir tampon solüsyonunda 0.05 mmol/L ksantin sodyum ve 0.025 mmol/L 2-(4-iyodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolium klorit (INT) içeren 825 µl substrat solüsyonu ile karıştırılır. Oksantin oksidaz (C125 ml, 80 U/ml) karışıma eklenerek absorbans artışı 505 nm'de 3 dakika izlenir [6].

Aebi tarafından belirtilen metot ile 25°C'de homojenatlarda ölçülerek burada substrat H₂O₂'nin dekompozisyon oranı, 30 saniye için 240 nm'de spektrofotometrik olarak izlenmesidir. Aktivite mU/g olarak ifade edilir [7]. Se-GPx aktivite tayin yönteminin esası, H₂O₂ varlığında indirgenmiş glutatyonun (GSH) Se-GPx tarafından okside glutatyon (GSSG) oksitlenmesi ve oksitlenen GSSG'nin glutatyon redüktaz enzimi aracılığıyla tekrar GSH'a dönüştürülmesi esnasında ortamda bulunan indirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid fosfa-

tın (NADPH) kullanılması ve kullanılan bu NADPH miktarındaki, dolayısıyla absorbansdaki azalmanın 340 nm dalga boyunda izlenmesi esasına dayanmaktadır. GPx aktivitesi U/g olarak tanımlanır. Eken ve arkadaşları tarafından tanımlanan prosedür kısaca; 50 mmol/L TRIS tamponunda (pH 7.6) hazırlanan 1 mmol/L Na₂EDTA, 2 mmol/L indirgenmiş glutatyon, 0.2 mmol/L NADPH, 4 mmol/L sodyum azid ve 1000 U glutatyon redüktaz içeren bir karışımın 950 µl ile 50 µl doku homojenatı karıştırılır ve 37°C'de 5 dakika inkübasyona bırakılır [7]. Reaksiyon, 8.8 mmol/L hidrojen peroksit eklenmesiyle başlatılır ve 3 dakika için 340 nm'de okunan absorbansların azalışı kaydedilir.

Lipid peroksidasyon ürünlerinden olan malondialdehit (MDA) tayini, tiyobarbütirik asit (TBA) ile MDA'nın reaksiyon vererek 532 nm dalga boyunda ölçülebilen renkli bir bileşik vermesi esasına dayanmaktadır. Tetrametoksipropan standart olarak kullanılır. Sonuçlar nmol/g şeklinde ifade edilir. Eken ve arkadaşları tarafından tanımlanan yöntem kısaca, doku homojenatından 0,5 ml alınarak üzerine 0,5 ml fosfat tamponu, 0,5ml % 15'lik trikloroasetik asit solüsyonu ilave edilerek vortekslenir ve buz keseleri üzerinde 2 saat tutulur [8]. 4°C'de 4400 rpm'de 10 dakika santrifüj edilir. Sonra 1 ml süpernatant alınır üzerine 75 µl 0.1 M EDTA ve 250 µl 0,05 N NaOH içerisinde hazırlanmış % 1'lik TBA solüsyonu ilave edilir, 15 saniye vortekslenir ve kaynayan su banyosunda 15 dakika tutulur. Absorbanslar 532 nm dalga boyunda köre karşı spektrofotometrede ölçülür.

İstatistiksel analiz

Tüm istatistiksel analiz ve hesaplamalar SPSS for Win. Ver. 15.00 (SPSS Inc., Chicago, IL., USA) paket programında çalışıldı. Çalışma kapsamında elde edilen ölçüm değerlerinin normal dağılıma uygunluğu grafiksel olarak ve

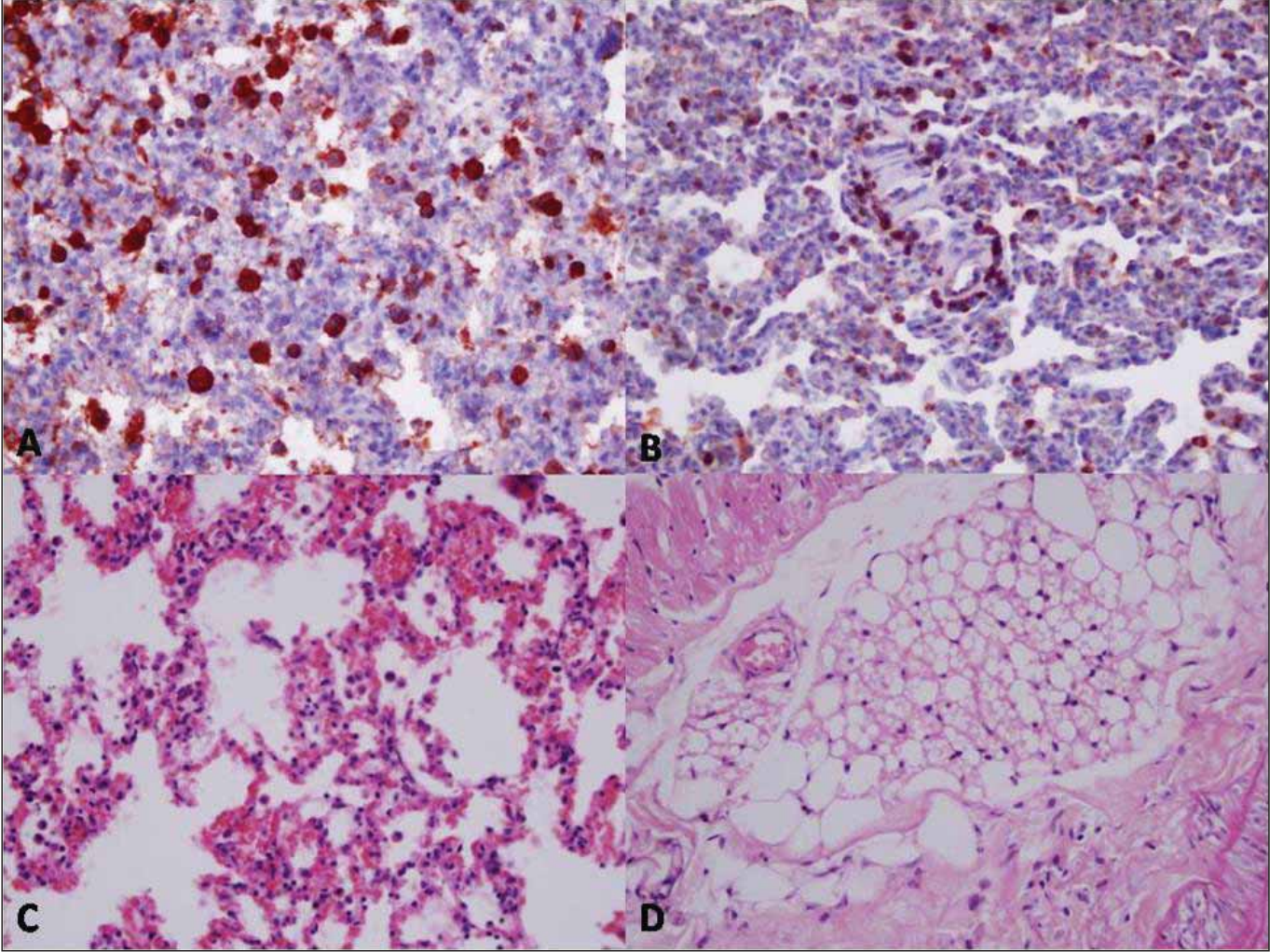
Shapiro-Wilk testi ile istatistiksel olarak incelendi. Değişkenlerden MDA ve CAT değişkenlerinin normal dağılıma uymadığı tespit edildiğinden bu değişkenlerin analizi için Mann-Whitney U testi, normal dağılıma uygun olan SOD ve GPX değişkenleri için Student-t testi uygulanmıştır.

Bulgular

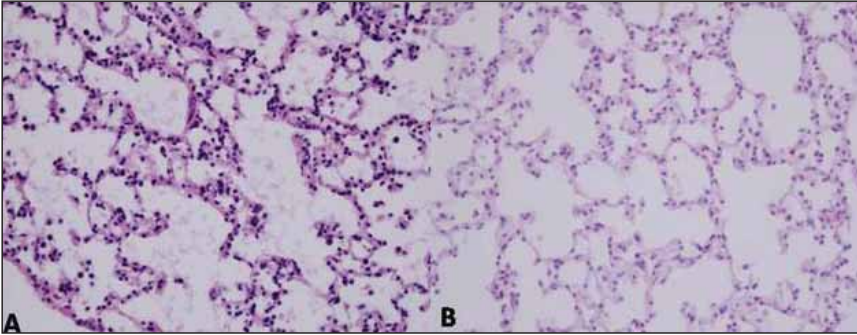
Histopatolojik incelemede kontrol grubuna göre İRG'de konjesyon, kanama, parankimal makrofaj ve PMN lökosit infiltrasyonu, amfizem, ateletazi, vakuolar dejenerasyon ve peribronşiyal lenfosit infiltrasyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı sonuç elde edildi (Resim 3, 4). Tablo 1'de gruplara göre ortalama skorların dağılımı özetlenmiştir.

Tüm gruplara ait biyokimyasal sonuçlar aşağıda tablo 2'de özetlenmiştir.

İncelenen parametrelerin dördünde de istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur. MDA seviyesi ve GPX aktivitesinde İRG grubunda ortalama artarken, SOD ve CAT aktivitesinde İRG ortalama azalmıştır.



Resim 3. İ/R grubundaki bir denekte immünohistokimyasal olarak CD68 (3A) ve MPO (3B) ile işaretlenen alveolar makrofajlar ve PMN lökositler (x100), 3C: İ/R grubundaki bir denekte konjesyone akciğer parankimi (HEx100) 3D: İ/R grubundaki bir denekte yağ dokusunda vakuolar dejenerasyon (HEx100).



Resim 4. İ/R grubundaki bir denekte hafif şiddette intraalveolar ödem oluşumu (HEx100)(4A) : Kontrol grubundaki bir deneğin normal akciğer parankimi (HEx100)(4B).

Tablo 2. Gruplara ait toplu biyokimyasal sonuçlar.

Değişken	Group	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum	Median	Test istatistiği	p
MDA	KG	7	8.68	0.43	8.08	9.20	8.72	-3.134	0.002***
	IRG	7	17.06	0.08	16.92	17.19	17.08		
SOD	KG	7	689.00	31.59	631.00	724.00	701.00	5.92	0.00***
	IRG	7	551.86	52.51	449.00	606.00	549.00		
GPX	KG	7	14.58	0.61	13.71	15.41	14.63	-4.72	0.00***
	IRG	7	16.38	0.81	15.01	17.28	16.74		
CAT	KG	7	4.30	0.19	4.05	4.53	4.27	-3.130	0.002***
	IRG	7	3.09	0.17	2.87	3.34	3.09		

(***:p<0.001 anlamlılık düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı farkı göstermektedir.)

Tablo 1. Gruplara göre histopatolojik bulgular.

Histopatolojik Bulgular	Ortalama Skor	
	Kontrol	İ/R
Peribronşiyal lenfositik infiltrasyon	3.1	4.6*
Parankimal makrofaj infiltrasyonu	1.1	4.4*
Parankimal lenfosit infiltrasyonu	0.3	2.1*
Parankim PMN lökosit infiltrasyonu	0.1	1.8*
Perivasküler PMN lökosit infiltrasyonu	0.1	0.4
Perivasküler lenfosit infiltrasyonu	0.1	0.3
Damar içi PMN lökosit infiltrasyonu	0.1	0.4
Perivasküler ödem	0.1	0.3
Atelektazi	0.3	1*
Amfizem	0.3	1.1*
Alveolar ödem	0.1	0.3
Yağ dokusunda vakuolar dejenerasyon	0	0.5*
Konjesyon	0.1	1*
Kanama	0.1	0.9*

(*:p<0.05 anlamlılık düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı farkı göstermektedir.)

Tartışma

AT modellerinde cerrahi teknik açısından domuz ve köpek tercih edilmektedir [2,9,10]. Köpeklerin deneysel çalışmada kullanılması etik sorunlar nedeniyle son derece sınırlıdır. Domuzlar ise yeterli sayıda deneğe etik onay alınmaması, deneğin bakımı, beslenmesi, üretilmesindeki zorluk ve mali sorunlar nedeniyle tercih edilmemektedir. Rat küçük, dayanıklı, kolay beslenmesi, hızlı üretilmesi, maliyetinin düşük ve perioperatif bakımının rahat yapılabilmesi nedeniyle AT'da daha çok tercih edilmektedir [2,5,9,10]. Bu çalışmada hastanenin imkânları da göz önüne alınarak rat kullanıldı.

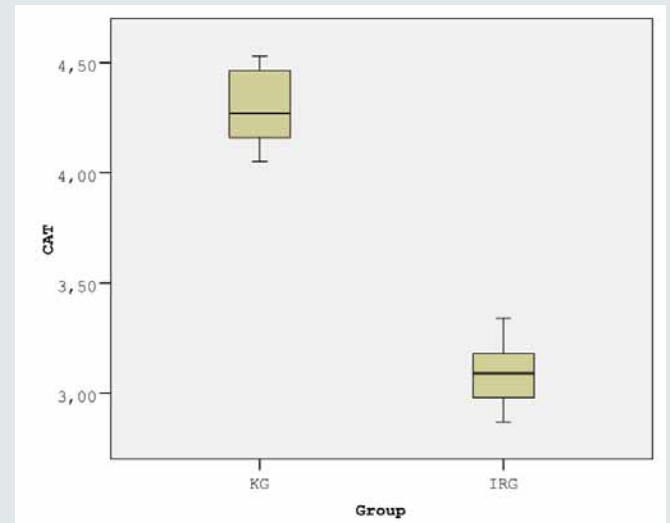
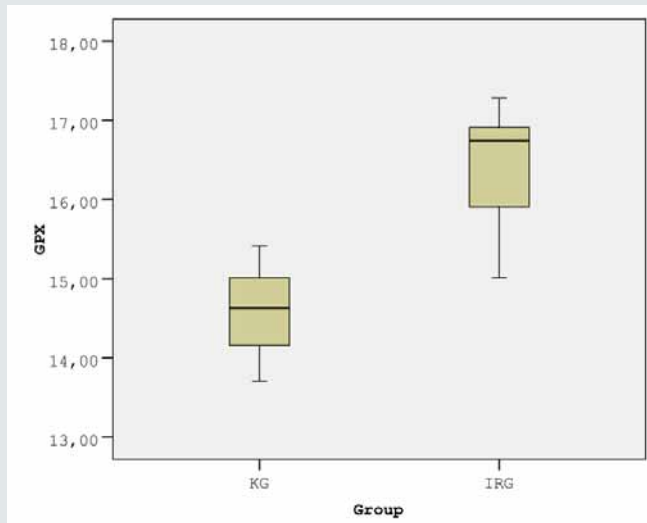
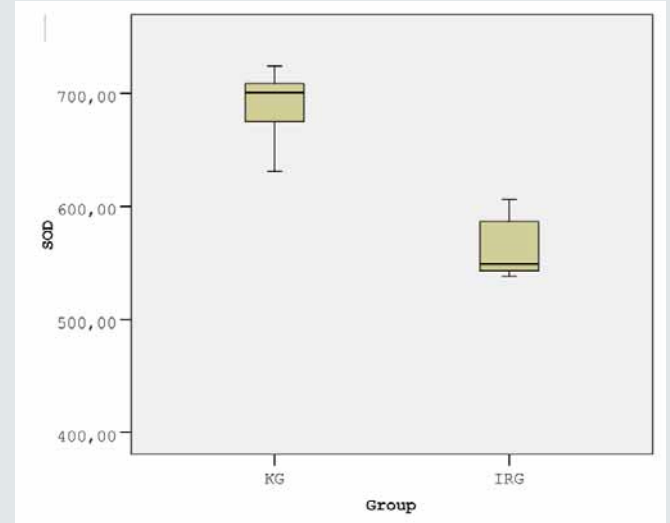
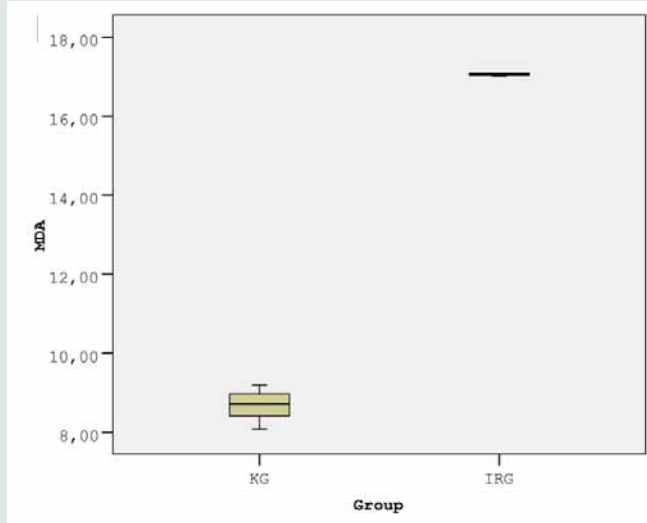
AT modelinde elde edilen verilerin doğru yorumlanabilmesi için doku rejeksiyonu ve kan uyumsuzluğu gibi immunolojik tabloların, çalışma sonuçlarını etkilememesi gerekmektedir. İnbred deneklerde doku rejeksiyonu ve kan uyumsuzluğu gibi immunolojik tablolar çok nadiren gözlenmektedir. Doğal olarak, inbred ratların kullanıldığı AT modellerinde bu tablolar yok denecek kadar az gözlenmektedir [11,12]. Bu

çalışmada da sonuçların güvenilirliğini arttırmak için inbred rat kullanıldı.

AT'de en önemli noktalardan biri de alıcı ve vericilerde pulmoner arter, pulmoner ven ve bronş çapı gibi anatomik ölçülerin birbirine uygun olmasıdır [4,13]. Denek temini sırasında yapılan ön çalışmayla tüm bu sebepler göz önüne alınarak en rahat, uygun alıcı-verici denek eşleşmesinin ratlarda sağlanabileceği düşünüldü.

Rat gibi küçük deney hayvanlarında transplantasyon işlemi teknik açıdan zordur [2,9]. İlk küçük hayvan transplantasyon teşebbüslerinde vasküler ve bronşial anastomoz tekniğinde zorluklar yaşanmıştır. Bu çalışmalarda uzamış cerrahi süre ve yüksek postoperatif mortalite nedeniyle çok az araştırmacı başarılı olmuştur [9]. 1989 yılında Mizuta ve arkadaşlarının cuff tekniğini geliştirmesiyle ratlarda transplantasyon işlemi önemli ilerlemeler kaydedilmiştir [5,8-11]. Daha sonra pek çok araştırmacı bu tekniği modifiye etmiştir. Cuff tekniği ve modifiye edilmiş birçok tekniğin uygulanabilmesi için yeterli cerrahi tecrübe

Tablo 2'ye ait Blog-Spot grafikleri:



gerekmektedir [5,9]. Bu çalışmada da cuff tekniği modifiye edilmiştir. Küçük deney hayvanlarıyla yapılan AT modellerinde damar anastomozu mikrocerrahi prosedürleri gerektirdiğinden iskemi süresi uzamaktadır. Bu çalışmayla geliştirilen AT modelinde mikrocerrahi prosedüre gerek duyulmamaktadır. Operasyon esnasında vasküler uc-uca anastomoz yapılmadığı için işlem süresi çok kısadır. Dolayısıyla AAD'ye transplantasyon esnasında uzun süreli iskemiye maruz kalmamaktadır.

Çalışmamızda verici deneklerin vasküler yapıları sakrifikasyon öncesinde kateterize edildi. Kateterizasyon işlemi yapılmadan önce vasküler yapı serbest 5/0 ipek sütürlü askıya alındı. Daha sonra makas yardımıyla cut-down uygulandı. Cut-down uygulama yerinden vasküler yapının distali veya proksimali yönünde kateter yerleştirildi. Damar trasesine hakim olabilmek için cerrahi işlem esnasında askı sütürleri gevşetilerek kan geçişine izin verildi. Çünkü kan dolaşımı durduğunda vasküler yatak boşalmakta ve damar kollabe olmaktadır. Kollabe damar yatağının açılması esnasında vasküler laserasyon gözlenebilmektedir. Bu laserasyon önemli başarısızlık nedenlerinden biridir. Kollabe olmuş vasküler yapıyı çıplak göz ile kateterize etmek hemen hemen imkansız olmaktadır. Bu nedenle çalışmamızda vasküler kateterizasyon işlemi damar yatağı doluyken gerçekleştirdik. Diğer birçok çalışmada vasküler yapılar önce kesilmiş daha sonra kateterize edilmiştir. Bu hem ekstra cerrahi alet (mikroskop) kullanılmasını gerektirmekte hem de operasyon süresinin uzamasına neden olmaktadır.

Rat AT modellerinde vasküler kateterizasyon için genellikle 14-16 G anjiocath kateter kullanılmıştır [2,3,5,9,11]. Bu kateterler çalışmada kullanılan ratlara uygun bulunmadı. Çünkü diğer çalışmalarda sol ana pulmoner arter ve ven gibi ana vasküler yapılar kateterize edilirken bu çalışmada alt lob arter ve veni kateterize edilmiştir. Kateterize edilen vasküler yapının damar çapı daha küçüktür. Bu nedenle kateterizasyon işleminde daha küçük çaplı (20 G) epidural kateterler kullanıldı. Kateter çapının küçük olması daha az miktarda kan ile kateter hattının dolmasını sağladı. Dolayısıyla deneklerde hipovolemi bulguları gözlenmedi.

Transplantasyon modellerinde bronş anastomozunda uc-uca anastomoz tekniği uygulanmıştır. Perrot ve ark.'nın çalışmasında transplante edilen lobun daha efektif ventilasyonu için allograft akciğer dokusu denekten bağımsız olarak ventilatör yardımıyla ventile edilmiştir [3]. Bu çalışmada allograft akciğere 0.2 cc tidal volüm oda havası,

60 solunum/sayı ve PEEP 1.5 cm H₂O geçmeyecek şekilde sağ akciğerden bağımsız reventilasyon uygulandı. Burada bağımsız ventilasyon uygulanması AAD'nun daha efektif ve kontrollü ventile olmasını sağladı. Özellikle sağ akciğerin barotravmaya maruz kalması önlenildi. İskemi esnasında ventilasyon yapılmaması allograft akciğerde atelektaziye neden olur. Bunlara ek olarak anastomoz distalinde alveolar epiteldeki iskemi hasarına bağlı sürfaktan düzeyi azalmakta ve akciğerde atelektazi gelişmektedir. Her iki akciğerin bağımsız olarak ventile edilememesi durumunda, kollaps olan allograft akciğerin atelektaziye yenip normal ventile olması için daha fazla PEEP uygulanmakta ve sağlam akciğerde barotravmaya yol açmaktadır. Tek akciğer transplantasyon modellerinde bağımlı ventilasyon uygulandığında alveolar şant ve ventilasyon-perfüzyon (V/Q) bozukluğu ile ilgili sonuçlar ortaya çıkabilmektedir [3]. Çoğu zaman PEEP'in artırılması bile atelektaziye önlemede yeterli olmamaktadır. Dolayısıyla allograft akciğerde kollapsa bağlı V/Q bozukluğu ortaya çıkmaktadır [3]. Çalışmamızda sağ akciğerden bağımsız olarak allograft akciğerin ventile edilmesiyle V/Q bozukluğunun en aza indirgenmesine çalıştık. Bunlara ek olarak bronş anastomozu sırasında geçen zaman kaybı önlenildi. Başarılı sınırlayacak olan anastomoz hattındaki hava kaçağı ihtimali ortadan kaldırılmış oldu. Oniki saat üzerindeki soğuk iske mi durumunda progresif atelektaziye bağlı akciğer fonksiyonlarında bozulma meydana gelmektedir [3]. Bu problemi çözmeye bağımsız ventilasyon kullanılabilir. Bunlara ek olarak bağımsız ventilasyon sayesinde allograft akciğerden bronkoalveolar lavaj ve bronş biyopsisi yapılabilir. Ayrıca komplians ve hava yolu basınçları gibi solunum parametrelerindeki değişiklikler ölçülebilir. Bu parametrelerdeki bozukluklar AAD'de oluşan hasarı göstermektedir [3]. I/R'ye bağlı akciğer üzerinde oluşan hasarın ayırıcı tanısında bu parametreler kullanılabilir.

Deneysel çalışmaların uygulandığı çoğu araştırma-geliştirme merkezlerinde torasik cerrahi işlemlerin uygulanması için yeterli teknik donanım bulunmamaktadır. Özellikle küçük deney hayvanlarının torasik cerrahi girişimlerinde mekanik ventilatör desteği gerekmektedir. Çalışmamızda denekler manuel olarak ventile edildi. Entübasyona bağlı komplikasyon gözlenmedi. Böylece çalışmanın maliyeti düşürüldü.

Günümüzdeki birçok teknik ilerlemeye karşın AT rat modellerinde vasküler anastomoz sorun olmaya devam etmektedir. Deneklerde vasküler yapıların yeteri kadar uzun olmaması anastomoz hattında gerginliğe yol açabilmek-

te ve cerrahi manipülasyonu da zorlaştırmaktadır [9]. Pulmoner ven anastomozu yapılırken çok dikkatli olunmalıdır. Çünkü pulmoner ven anastomoz esnasında çok rahatlıkla yırtılabilir [9]. Anastomoz hattındaki kaçağa bağlı olarak reperfüzyon esnasında denek kısa sürede kaybedilebilmektedir. Cerrahi ekip, anastomozun rahat uygulanabilmesi için vasküler yapıların uzun bırakılmasını tercih etmektedir. Bunu sağlamak için kalbe mümkün olduğu kadar yakın klempler yerleştirilir [9]. Burada, vasküler yapı klempe edilirken sol atrium da klempe edilebilir [9]. Daha sonra atrium obstruksiyonuna bağlı denek kaybedilebilir. Çalışmamızda vasküler anastomoz uygulanmadığından bu tip komplikasyonlarla da karşılaşmadık. Anastomoz esnasında diğer önemli noktalardan biri de damar endotelinde oluşan hasara bağlı trombüslerin veya kate-terizasyon esnasında hava embolisinin oluşmasıdır [9]. Bazı çalışmalarda trombozu engellemek için anastomozda “turnover tekniği” uygulanmıştır [2,11]. Çalışmamızda ise damar endoteline hasar verilmediği için turnover tekniğine gerek duyulmamıştır. Bu modelde damar endote-

line hasar verilmemekle birlikte vasküler katetere bağlı komplikasyonlar için de önlem alınmıştır. Kateter AAD'de hasar oluşturmaması için damar lümeninde fazla ilerletilmedi. Kateterin fazla ilerletilmesi pulmoner arter dallanmalarında tıkanıklığa sebep olabilmekte ve ven dallanmalarında geri dönüşü engelleyebilmektedir.

Çalışmamızda elde edilen histopatolojik ve biyokimyasal bulgular İ/R hasarı sonrası ortaya çıkan bulgulardır [14-16].

Sonuç

AT için kolay uygulanabilir standardize edilmiş bir modelin gerekli olduğu birçok çalışmada vurgulanmaktadır [2,9]. AT'de deneysel çalışmalar için farklı modeller tasarlanmıştır [2,8,11]. Bu çalışmada ortaya konulan AT modeli İR hasarını göstermek amacıyla geliştirilmiştir. Bu modelin en önemli avantajları geliştirilebilir, düşük maliyetli ve cerrahi prosedürünün kısa olmasıdır. Ortaya konulan bu model, deneklerin daha uzun süre yaşamasının gerektiği AT çalışmaları için modifiye edilebilir.

Kaynaklar

- Kelly RF. Current strategies in lung preservation. *J Lab Clin Med.* 2000;136:6:427-40.
- Sanchez PG, Martins LK, Martins FK, Schimer R, Cardoso PFG, Andrade CF. Technical modification of unilateral lung transplantation in rats *J Bras Pneumol.* 2007;33:4:448-53.
- Perrot M, Quadri SM, Imai Y, Keshavjee S. Independent Ventilation of the Graft and Native Lungs In Vivo After Rat Lung Transplantation. *Ann Thorac Surg.* 2005;79:2169-71.
- Baez B, Castillo M. Anesthetic consideration for lung transplantation. *Semin Cardiothorac Vasc Anesth.* 2008;12:2:122-7.
- Sugimoto R, Nakao A, Nagahiro I, Kohmoto J, Sugimoto S, Okazaki M et.al. Experimental orthotopic lung transplantation model in rats with cold storage. *Surg Today.* 2009;39:7:641-5.
- Eken A, Aydın A, Sayal A, Üstündağ A, Duydu Y, Dündar K. The Effects of Hyperbaric Oxygen Treatment on Oxidative Stress and SCE Frequencies in Humans. *Clin Biochem.* 2005;38:1133-1137.
- Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 1984;105:121-6.
- Zhang QC, Wang DJ, Yin N, Yin BL, Fang RX, Xiao XJ et.al. The orthotopic left lung transplantation in rats: a valuable experimental model without using cuff technique. *Transpl Int.* 2008;21;11:1090-7.
- Rodriguez NS, Barrasa JLM, Garcia AL, Suarez PR, Gonzalez MP, Gilart JF. Lung transplantation in rats: a viable experimental model. *Arch Bronconeumol.* 2004;40;10:438-42.
- Tavakoli R, Devaux JY, Nonnenmacher L, Louvel A, Houssin D. Technique and results of lung transplantation in rats. *Ann Chir.* 1991;45;7:627-33.
- Zhai W, Ge J, Inci I, Hillinger S, Markus C, Korom S et.al. Simplified rat lung transplantation by using a modified cuff technique. *J Invest Surg.* 2008;21;1:33-7.
- Reis A, Giaid A, Serrick C, Shennib H. Improved outcome of rat lung transplantation with modification of the non-suture external cuff technique. *J Heart Lung Transplant.* 1995;14;2:274-9.
- Kawaguchi AT, Mizuta T, Shirai M, Ishibashi-Ueda H, Machida H, Kawashima Y. Right lung transplantation followed by left pneumonectomy in the rat. *Eur J Cardiothorac Surg.* 1996;10;11:1011-4.
- Sugimoto S, Lin X, Lai J, Okazaki M, Das NA, Li W, Krupnick AS, Chen R, Jeong SS, Patterson GA, Kreisel D, Gelman AE., Apyrase treatment prevents ischemia-reperfusion injury in rat lung isografts. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2009;138:752-9.
- Kang MQ, Lin PQ, Lin RB, Huang XS, Lin X, Zheng YH, Liao CX, Chen DZ. Isografts on subsequent ischemia-reperfusion injury: experiment with rats. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 2007;25;87:3425-8.
- Li G, Chen S, Lou W, Lu E. Ischemic preconditioning enhances donor lung preservation in canine lung transplantation. *Chin Med J (Engl).* 1998; 111:870-3.